

# Efek Sinergis Kombinasi Ekstrak Air Akar Batu (*Gerrardanthus Macrorrhizus*) dengan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara T47D

## *SYNERGISTIC EFFECT OF AKAR BATU (GERRARDANTHUS MACRORRHIZUS) AQUEOUS EXTRACT IN COMBINATION WITH DOXORUBICIN ON T47D BREAST CANCER CELLS*

\*Sari Haryanti, Yuli Widiyastuti, dan Rohmat Mujahid

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional,  
Jl. Raya Lawu No. 10, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah

\*E-mail:sari.haryanti@gmail.com

*Submitted : 23-05-2018, Revised : 06-06-2018, Revised : 01-08-2018, Accepted : 09-08-2018*

### **Abstract**

*Doxorubicin is one of the most widely used chemotherapy agents in cancer therapy. The clinical results of doxorubicin are limited by cardiotoxic side effects which relate to their doses. This study was conducted to investigate cytotoxic activity of caudex *Gerrardanthus macrorrhizus* aqueous extract and its combination with doxorubicin on T47D cells. Dried caudex powder was extracted by infusion method, evaporated in oven 40°C to get dried extract (GM). The MTT assay was performed triplo to determine cytotoxic effect, either alone or in combination. Flow cytometry was used to observe cell cycle profile and apoptotic induction. Based on the observation under inverted microscope, GM alone did not exhibit cytotoxic effects but showed morphological alteration becoming rounded and shrinkaged cells compared to untreated cells. Nevertheless, GM 40 µg/mL was able to improve cytotoxic effect of doxorubicin to 51%. Combination treatment of doxorubicin 3 nM and 40 µg/mL GM inhibited T47D cell cycle in G2/M phase. This combination also resulted apoptotic induction, compared to untreated cell and each single treatment. Based on the results, caudex *G. macrorrhizus* is potential to be further investigated as a co-chemotherapy agent with doxorubicin.*

**Keywords :** synergistic, cytotoxic, cell cycle, *Gerrardanthus macrorrhizus*, T47D

### **Abstrak**

Doxorubicin adalah salah satu agen kemoterapi yang digunakan secara luas dalam terapi kanker. Hasil klinis doxorubicin dibatasi oleh kardiotositas yang berkorelasi dengan besaran dosis. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji aktivitas sitotoksik ekstrak air caudex *Gerrardanthus macrorrhizus* dan kombinasinya dengan doxorubicin pada sel T47D. Serbuk caudex *G. macrorrhizus* (GM) kering diekstraksi dengan metode infusa, kemudian diuapkan dalam oven 40°C. Uji MTT dilakukan untuk menguji efek sitotoksik ekstrak dengan tiga ulangan, baik tunggal maupun kombinasi dengan doxorubicin. Flow cytometry digunakan untuk mengetahui profil siklus sel dan induksi apoptosis. Hasil pengamatan di bawah mikroskop inverted menunjukkan ekstrak tunggal GM tidak memberikan efek sitotoksik namun mengakibatkan perubahan morfologi pada sel T47D menjadi membulat dan mengerut dibandingkan kontrol sel. Ekstrak GM 40 µg/mL mampu meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin 3 nM hingga 51%. Kombinasi doxorubicin 3 nM dan ekstrak 40 µg/mL menghambat siklus sel pada fase G2/M dan meningkatkan induksi apoptosis, dibandingkan kontrol sel dan masing-masing perlakuan tunggalnya. Berdasarkan hasil penelitian ini, caudex *G. macrorrhizus* berpotensi untuk diteliti lebih lanjut sebagai agen ko-kemoterapi dengan doxorubicin.

**Kata kunci:** sinergistik, sitotoksik, siklus sel, *Gerrardanthus macrorrhizus*, T47D

## PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang paling banyak diderita wanita di dunia. Angka kejadian kanker payudara mencapai 18% dari semua jenis kanker yang diderita wanita di Asia-Pasifik. Tiga Negara Asia-Pasifik dengan angka kejadian terbesar berada di China (46%), Jepang (14%), dan Indonesia (12%). Hingga tahun 2012, angka kematian karena kanker payudara berada pada kisaran 41% di China, 17% di Indonesia, dan 12% di Jepang.<sup>1</sup> Berdasarkan hasil riset PTM (Penyakit Tidak Menular), Badan Litbangkes tahun 2016, menunjukkan prevalensi tumor payudara berdasarkan pemeriksaan Sadanis positif pada 38.749 orang dari 43.948 orang penduduk wanita di perkotaan Indonesia sebesar 8,1%.<sup>2</sup> Pengembangan terapi kanker payudara masih sangat diperlukan untuk meningkatkan persentase penyembuhan, menurunkan kekambuhan, mengurangi kematian, dan meningkatkan kualitas hidup penderita. Agen kemoterapi memiliki beberapa keterbatasan antara lain resistensi, efek samping, dan daya efikasi kurang memadai.<sup>3</sup>

Doxorubicin adalah agen yang secara luas digunakan untuk kemoterapi kanker, termasuk kanker payudara. Masalah klinis utama yang dihadapi dalam penggunaan doxorubicin adalah efek samping berupa kardiotoxik.<sup>4</sup> Salah satu pengembangan terapi untuk menurunkan efek kardiotoxik dan meningkatkan efikasi diarahkan pada terapi kombinasi dengan agen kemopreventif dari bahan alam.<sup>3</sup> Kemoprevensi didefinisikan sebagai suatu substansi yang dapat membalikkan, menekan, dan atau mencegah perkembangan karsinogenesis lebih lanjut.<sup>5</sup> Target penting dalam kemoprevensi adalah siklus sel untuk menghambat proliferasi sekaligus memacu terjadinya apoptosis sel kanker.<sup>6</sup>

Salah satu pendekatan untuk menemukan senyawa kemopreventif adalah melalui eksplorasi bahan alam terutama tumbuhan.<sup>7</sup> Indonesia memiliki kekayaan potensial berupa tumbuhan dengan jenis yang beraneka ragam. *Gerrardanthus macrorhizus* atau akar batu, merupakan salah satu tumbuhan Cucurbitaceae, berasal dari Afrika<sup>8</sup>, memiliki bentuk unik dan belum banyak dikenal di Indonesia. Akar batu memiliki batang di atas tanah yang menggembung dan menarik, disebut dengan *caudex* (*macrorhizus* artinya akar besar). Akar batu tumbuh di tempat teduh di atas tanah maupun bebatuan, tumbuh dengan cepat, berdaun hijau memanjang, berbunga orange dan berbuah oblong.<sup>9</sup>

Berdasarkan hasil Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (Ristoja) tahun 2012, bagian *caudex* tanaman ini

dimanfaatkan oleh pengobat tradisional di etnis Tetun, NTT untuk mengobati kanker. Tumbuhan ini berhasil diadaptasikan dan diperbanyak di rumah kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T) Tawangmangu. Perbanyakannya menggunakan stek batang maupun *caudex*. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak air beberapa tumbuhan yang digunakan penyehat tradisional dalam Ristoja, menunjukkan akar batu sebagai ekstrak yang paling potensi efeknya pada sel MCF-7.<sup>10</sup> Berdasarkan penelusuran pustaka yang kami lakukan, kajian ilmiah mengenai aktivitas tumbuhan ini belum banyak dilaporkan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji aktivitas sitotoksik *caudex* akar batu baik tunggal maupun kombinasi dengan doxorubicin melalui target aksi penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis pada sel kanker payudara T47D secara invitro. Hasil penelitian diharapkan menjadi dasar pengembangan dan salah satu alternatif dalam pengobatan komplementer dengan kemoterapi konvensional.

## BAHAN DAN CARA

Bahan dan kultur sel. Simplisia segar *caudex* *G. macrorhizus* diperoleh dari Kabupaten Belu, Nusa Tenggara Timur, diidentifikasi oleh pakar sistematika tanaman di B2P2TO2T. Selanjutnya, pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Galenika B2P2TO2T. Serbuk diekstraksi dengan metode infusa, disaring, diletakkan dalam wadah datar sehingga lapisan air tidak terlalu tebal, kemudian dikeringkan di dalam oven suhu 40°C selama dua hari hingga didapatkan ekstrak kering. Pengeringan ekstrak air dengan cara tersebut lebih cepat karena kontak permukaan dengan panas lebih lebar dan merata. Penyari air memiliki titik didih tinggi (>100°C) sehingga membutuhkan waktu lama jika dikeringkan dengan evaporator. Sel kanker payudara T47D merupakan koleksi Laboratorium Biologi Molekuler, B2P2TO2T, pertama kali diperoleh dari Cancer Chemoprevention Research Centre (CCRC), Fakultas Farmasi UGM. Sel dipelihara dalam media kultur yang berisi Dulbecco Modified Eagle Media (DMEM, Gibco), fetal bovine serum 10% (v/v) (FBS, Gibco), dan penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco) sebagai upaya preventif kontaminasi bakteri pada kultur sel. Uji sitotoksik, siklus sel, dan apoptosis dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, B2P2TO2T.

Uji sitotoksik. Uji dilakukan dengan MTT assay berdasarkan metode yang dilakukan Mosmann.<sup>11</sup> Sel T47D yang telah konfluen dipanen menggunakan trypsin EDTA 0,25% (Sigma). Jumlah sel dihitung dengan hemositometer. Kemudian sel

didistribusikan ke dalam sumur 96-well plate dengan jumlah 5000 sel/sumur. Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C. Larutan uji dibuat stok dalam pelarut dimetil sulfoksida (DMSO, Sigma) dengan konsentrasi 10 mg/100 µL, kemudian dilakukan pengenceran menggunakan media kultur sesuai seri konsentrasi yang ditentukan berdasarkan hasil orientasi sebelumnya (doxorubicin 1, 2, 3, 5 dan 10 nM dan GM 10, 20, 40, 80, 160 dan 320 µg/mL). Sel dicuci dengan phosphat buffer salin (PBS, Sigma), kemudian larutan uji dimasukkan ke dalam sumur (triplo). Sel diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Pada masa akhir inkubasi, larutan uji dibuang dan ditambahkan pereaksi MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) sejumlah 100 µL/sumur diinkubasi 3 jam, lalu ditambahkan pereaksi stopper sodium dodesil sulfat (SDS, Sigma) 10% dalam HCl 0,01N). Sel dibiarkan semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Hasil inkubasi dibaca dengan ELISA reader panjang gelombang 595 nm.<sup>11</sup>

Uji siklus sel dan apoptosis. Sel konfluen dipanen dan dihitung dengan hemositometer, sejumlah 107 sel/sumur didistribusikan ke dalam 6 well plate. Setelah inkubasi 24 jam, sel diberi perlakuan GM 40 µg/mL dan doxorubicin 1 dan 3 nM, baik tunggal maupun kombinasi selama 24 jam. Pada akhir perlakuan, media dimasukkan ke dalam conical. Sel dicuci dengan 500 µL PBS dan dimasukkan ke conical yang sama, ke dalam 6 well plate ditambahkan 200 µL trypsin-EDTA 0,25% selama 3 menit, ditambahkan 1000 µL media kultur dan diresuspensi sampai sel lepas. Sel ditransfer ke conical dan disentrifus 500 rpm selama 5 menit. Endapan sel difiksasi dengan etanol 70% dingin, dibiarkan 1 jam dalam suhu ruang. Sel disentrifus 2000 rpm 3 menit, dicuci dengan PBS dan disentrifus kembali. Endapan sel dalam conical ditambahkan 400 µL reagen PI (1 mg/mL propidium iodida (PI, Sigma), 10 mg/mL RNase (Sigma) dan 0,1% (v/v) Triton-X 100 (Sigma). Sel diresuspensi dan diinkubasi 5 menit dalam ruang gelap, kemudian suspensi sel ditransfer ke dalam tabung reaksi dan dianalisis dengan *flow cytometer* BD Accuri C6.<sup>12</sup> Untuk pengamatan apoptosis, sel yang telah diberikan ekstrak tunggal maupun kombinasi diperlakukan sama dengan tahapan uji siklus sel sampai diperoleh endapan sel. Supernatan dibuang, ditambahkan 100 µL annexin-V-FLUOS *staining* kit yang terdiri dari 100 µL anexin binding *buffer*, 2 µL anexin V dan 2 µL PI. Sel diinkubasi dalam ruang gelap selama 10 menit dan selanjutnya dianalisis dengan *flow cytometer*.<sup>13</sup>

Analisis Data. Data MTT assay dianalisis dengan regresi linier untuk melihat hubungan konsentrasi vs persentase viabilitas sel menggunakan

Excel MS Office 2013. Analisis nilai CI (indeks kombinasi) menggunakan software Compusyn. Data yang diperoleh dari alat *flow cytometer* dianalisis menggunakan Accuri C6 software.

**Tabel 1. Interpretasi nilai CI14**

CI	Interpretasi
< 0.1	Sinergis sangat kuat
0.1 – 0.3	Sinergis kuat
0.3 – 0.7	Synergis
0.7 – 0.9	Sinergis menengah
0.9 – 1.1	Mendekati aditif
1.1 – 1.45	Antagonis menengah
1.45 – 3.3	Antagonis
>3.3	Antagonis kuat

## HASIL

Sel T47D yang diberi perlakuan ekstrak *G. macrorrhizus* (GM) mengalami perubahan morfologi berupa sel yang membulat dan menyusut, serupa dengan tanda kematian sel terprogram (apoptosis). Penambahan MTT dilakukan untuk menentukan viabilitas sel. MTT hanya bisa dikonversikan menjadi kristal formazan oleh sel viable dengan metabolisme aktif.<sup>15</sup> Pengamatan di bawah mikroskop inverted menunjukkan, sel dengan perlakuan GM masih mampu membentuk formasi kristal formazan (Gambar 1A). Hal tersebut diperkuat dengan hasil analisis regresi linier yang menunjukkan bahwa viabilitas sel T47D tidak terpengaruh oleh perlakuan ekstrak GM (Gambar 1B). Berdasarkan kemampuan GM dalam mengubah morfologi sel T47D, diperkirakan ekstrak GM berpotensi meningkatkan sensitivitas sel T47D terhadap agen kemoterapi.

Sebelum dilakukan evaluasi kombinasi, dilakukan uji sitotoksik terhadap doxorubicin tunggal. Hasil analisis MTT pada perlakuan doxorubicin menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC<sub>50</sub> 6 nM (Gambar 2A.). Evaluasi efek sitotoksik kombinasi dilakukan menggunakan seri konsentrasi lebih kecil dari  $\frac{3}{4}$ IC<sub>50</sub> doxorubicin (1, 2, 3, dan 4 nM) dengan GM 10, 20, 40 µg/mL. Secara umum, GM berpengaruh terhadap efek sitotoksik doxorubicin menjadi lebih baik dibandingkan perlakuan tunggal doxorubicin. Perlakuan doxorubicin 4 nM tunggal menurunkan viabilitas sel menjadi 66,5%, sedangkan perlakuan GM tunggal 10, 20, dan 40 µg/mL menunjukkan viabilitas di atas 80%. sel kontrol Kombinasi doxorubicin 4 nM dengan GM 10 µg/mL belum meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin dengan viabilitas sel 73,0%. Kombinasi dengan GM 20 µg/mL mulai meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin sehingga viabilitas sel menjadi 62,0%, dan saat



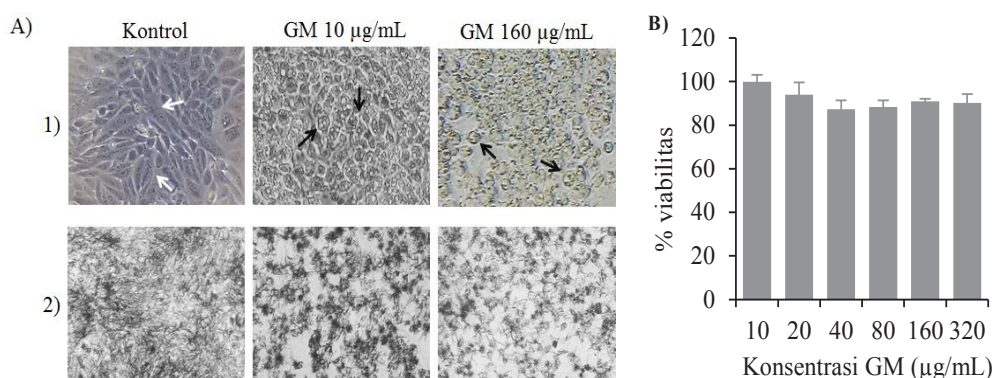
kombinasi dengan GM 40  $\mu\text{g/mL}$  menjadi 32,6% (Gambar 2B.).

Viabilitas tunggal maupun kombinasi kemudian dianalisis menggunakan *Compusyn software*. Kombinasi GM-doxorubicin menghasilkan nilai kombinasi indeks (CI) <1, yang mengindikasikan efek sinergisme (Gambar 3A). Perlakuan GM mampu mengurangi dosis doxorubicin dengan baik, yang ditunjukkan dengan nilai dose reducing index (DRI) >1, serta point kombinasi berada di bawah garis aditif isobologram (Gambar 3B).

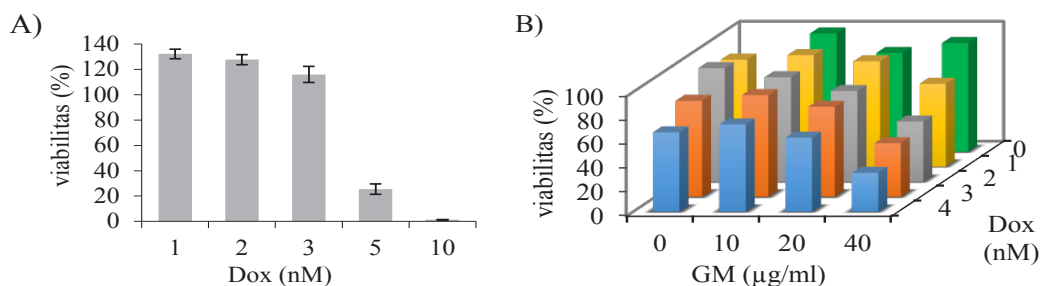
Selanjutnya, untuk mengetahui mekanisme sinergisme efek sitotoksik pada kombinasi GM-doxorubicin dilakukan uji profil siklus sel dan induksi apoptosis, pada kombinasi GM 40  $\mu\text{g/mL}$  dengan doxorubicin 1 dan 3 nM. Histogram siklus sel menunjukkan perlakuan tunggal GM tidak mengakibatkan perubahan siklus sel. Doxorubicin tunggal 1 dan 3 nM mengakibatkan G2/M arrested dengan peningkatan populasi sel di G2/M berturut-turut 35,8% dan 52,4% dibandingkan kontrol tanpa perlakuan (31,6%). Perlakuan kombinasi GM-

doxorubicin 1 nM meningkatkan populasi di fase G2/M menjadi 40,4%. Kombinasi GM dengan doxorubicin 1 dan 3 nM mengakibatkan populasi sel di ssuG1 berturut-turut menjadi 14,3% dan 44,3%, sedangkan sel kontrol sebesar 1,5% (Gambar 4).

Peningkatan populasi di fase subG1 merupakan petunjuk terjadinya kematian sel. Jenis kematian tersebut kemudian ditelaah lebih lanjut melalui uji apoptosis menggunakan *flow cytometry*. Deteksi sel apoptosis dengan *flow cytometer* menggunakan staining propidium iodide (PI) dan annexin V, merupakan metode yang telah diakui sebagai gold standard untuk menentukan persentase sel hidup, apoptosis, dan nekrosis. Histogram *flow cytometry* dibagi menjadi 4 kuadran yang menunjukkan distribusi sel hidup (kiri bawah), apoptosis awal (kanan bawah), apoptosis akhir (kanan atas), dan nekrosis (kiri atas).<sup>16</sup> Sel hidup tidak berikatan dengan kedua staining, berada di kuadran kiri bawah. Annexin V memiliki afinitas kuat terhadap phosphatidilserin yang terdeteksi di luar membran plasma.



**Gambar 1.** Karakterisasi morfologi dan hasil uji MTT assay pada sel T47D. Gambar A.1) menunjukkan perubahan morfologi sel karena perlakuan ekstrak GM (tanda panah putih: sel *viable*, panah hitam: sel *rounded* dan *shrinkaged*). Gambar A.2) kristal formazan terbentuk pada perlakuan GM seperti pada sel kontrol. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* perbesaran 200x. Gambar B) memperlihatkan grafik % viabilitas vs konsentrasi GM, data merupakan rerata dari tiga kali ulangan + SD. GM: *G.macrorrhizus*



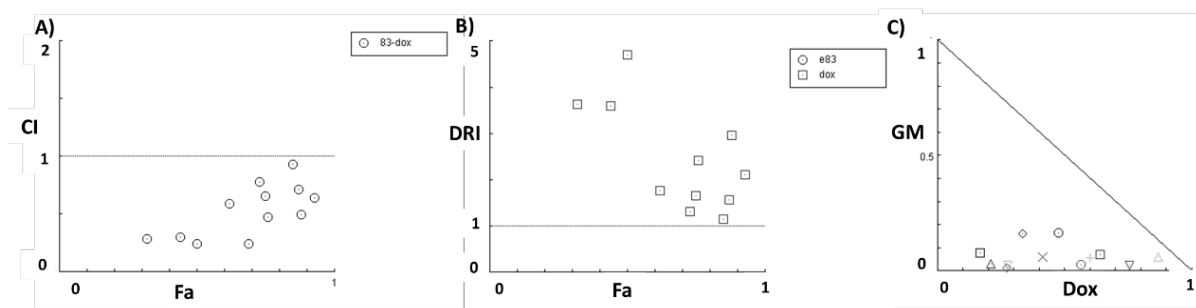
**Gambar 2.** Hasil uji MTT assay doxorubin tunggal dan kombinasi dengan ekstrak GM pada sel T47D. (A) Grafik konsentrasi doxorubicin tunggal vs % viabilitas. (B) Efek sitotoksik kombinasi GM dan doxorubicin. Data merupakan rerata dari tiga kali ulangan + SD. Dox: doxorubicin; GM: *G. macrorrhizus*

Translokasi phosphatidilserin dari sitoplasma menuju bagian luar membran merupakan salah satu karakteristik awal terjadinya apoptosis. Pada tahap ini, hanya staining annexin V yang terdeteksi sedangkan PI masih tertahan di luar membran.<sup>17</sup> Apoptosis awal diklasifikasikan sebagai single positif (Annexin V+, kanan bawah). Selanjutnya, terjadi penurunan integritas membran, sehingga PI masuk ke dalam nukleus dan berinterkalasi dengan DNA. Terjadinya ikatan PI dan annexin merupakan penanda sel berada pada fase apoptosis akhir, yang diklasifikasikan sebagai *double positive* (annexin V/PI+, kanan atas). Saat membran sel luruh, PI dengan mudah masuk dan terikat kuat (PI+, kiri atas).<sup>18</sup>

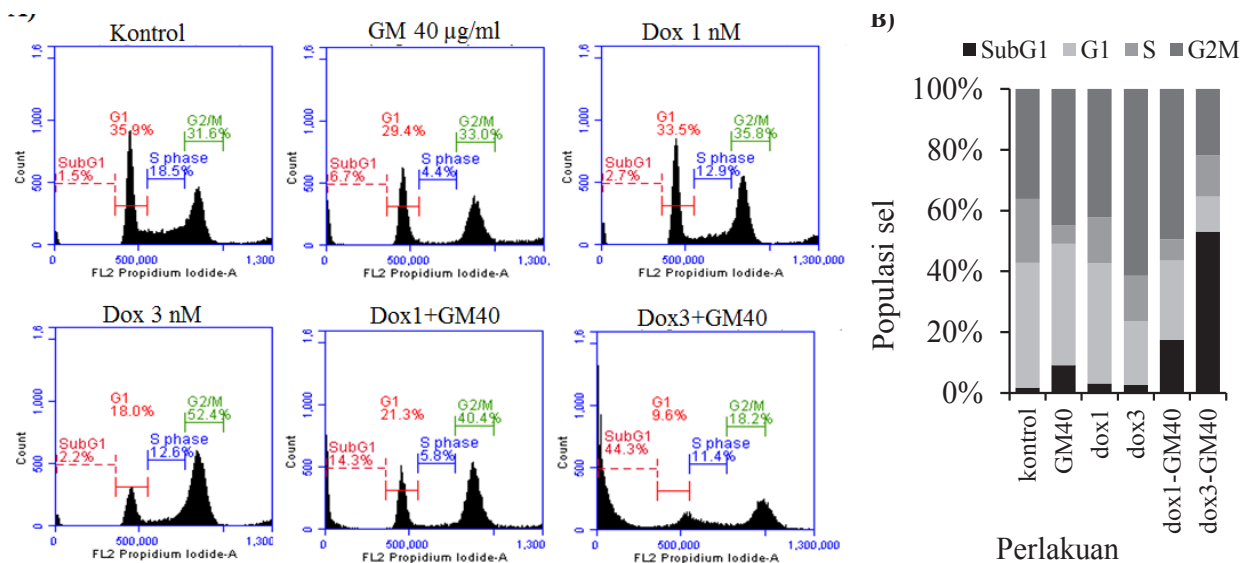
Menurut Crowley, dkk, 2016, jumlah sel apoptosis maupun nekrosis dalam suatu populasi bergantung pada durasi perlakuan dan tingkat

keparahan akibat perlakuan tersebut. Apoptosis merupakan suatu proses yang berjalan dengan cepat selama beberapa jam, dan sesudahnya sel akan mengalami nekrosis sekunder.<sup>19</sup> Kelemahan penelitian ini hanya menggunakan satu konsentrasi dalam satu durasi perlakuan (24 jam), sehingga proses terjadinya apoptosis menuju nekrosis belum bisa dijelaskan dengan pasti.

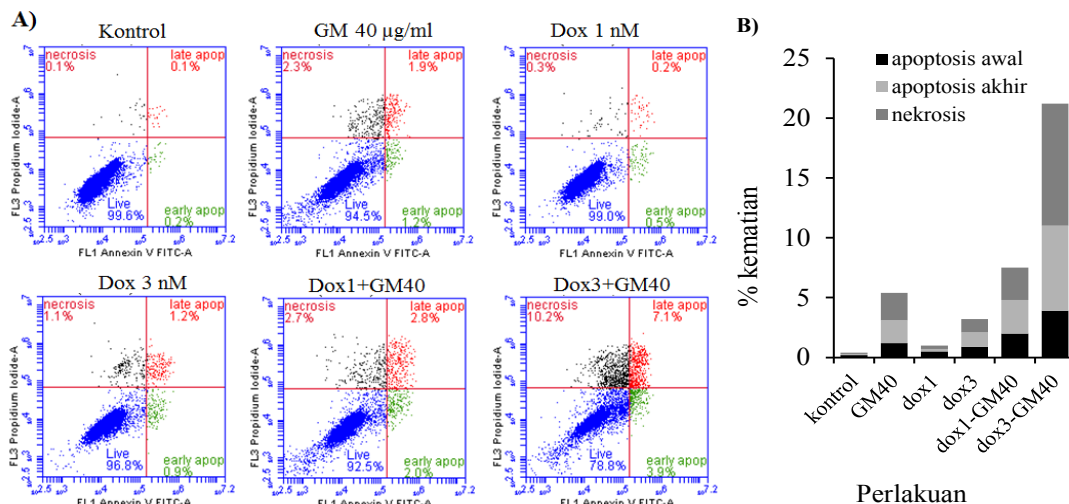
Histogram apoptosis menunjukkan kombinasi GM dengan doxorubicin 3 nM menginduksi sel apoptosis awal dan akhir sebesar 11,0% dan sel nekrosis 10,2% sedangkan sel kontrol tanpa perlakuan 0,7% dan 0,3%. Kematian yang disebabkan perlakuan kombinasi menunjukkan peningkatan dibandingkan masing-masing perlakuan tunggalnya (Gambar 5).



**Gambar 3.** Nilai CI dan DRI dari kombinasi GM dan doxorubicin pada sel T47D. A) Nilai CI < 1 menunjukkan efek sinergis. B) Nilai DRI dari GM terhadap dox > 1 menunjukkan pengurangan dosis yang tinggi. C) Isobologram, point kombinasi di bawah garis miring menunjukkan efek sinergis. Fa merepresentasikan viabilitas sel, Fa=1 artinya viabilitas sel 100%, Fa<1 viabilitas sel 0%.



**Gambar 4.** Profil distribusi siklus sel dengan staining propidium iodide (PI) dan flow cytometry. Sel T47D diberikan perlakuan tunggal GM, doxorubicin dan kombinasinya selama 24 jam. (A) Histogram siklus sel; (B) analisis populasi sel di setiap fase.



**Gambar 5.** Deteksi sel apoptosis dengan *double staining* propidium iodide (PI) - annexin V dan flow cytometry. Sel T47D diberikan perlakuan tunggal GM, doxorubicin dan kombinasinya selama 24 jam. A) Histogram sel apoptosis; B) analisis % kematian sel apoptosis/nekrosis.

## PEMBAHASAN

Perubahan morfologi menjadi *shrinkaged* dan *rounded cells* (menyusut dan membulat) adalah salah satu indikator awal terjadinya apoptosis.<sup>20</sup> Berdasarkan hasil MTT assay, perlakuan GM mengakibatkan sel T47D masih viable (>90%), namun memperlihatkan karakteristik morfologi yang mengindikasikan terjadinya aktivasi apoptosis. Apoptosis terkait dengan hampir seluruh proses fundamental dalam kehidupan, baik pada kondisi fisiologis maupun patologis. Sebagai salah satu jenis kematian sel terprogram, apoptosis menunjukkan desain seluler yang sangat rumit dan teratur.<sup>20</sup> Hambatan dalam proses apoptosis menyebabkan proliferasi terjadi secara terus menerus. Kemampuan sel untuk selalu memelihara signal proliferasi dan mengabaikan signal apoptosis merupakan karakteristik sel kanker.<sup>6</sup> Kegagalan apoptosis berperan penting dalam karsinogenesis, sehingga induksi apoptosis menjadi target dalam strategi terapi kanker.<sup>21</sup>

Sinergisme kombinasi GM-doxorubicin merupakan hasil modulasi proses fisiologis di dalam sel, di antaranya siklus sel dan apoptosis. Berdasarkan profil flow cytometry, doxorubicin menghambat siklus sel di fase G2/M. Hambatan tersebut diteruskan oleh GM, sehingga terjadi akselerasi induksi apoptosis, dan persentase kematian sel meningkat pada perlakuan kombinasi. Gangguan siklus sel pada fase tertentu akan menyebabkan efek sitotoksik spesifik dan membuat sel kanker lebih rentan terhadap apoptosis.<sup>22</sup> Berhentinya siklus sel (arrest) menggambarkan terjadinya mekanisme pertahanan diri sel kanker

untuk memperbaiki kerusakan DNA. Agen yang dapat mengganggu siklus sel sebelum proses perbaikan sempurna, akan mengaktivasi signal yang mengarah pada kematian sel.<sup>23</sup>

Interaksi sinergisme bermanfaat untuk terapi penyakit kompleks seperti kanker dengan tujuan utama peningkatan efek, reduksi dosis dan toksisitas, serta mencegah resistensi.<sup>24</sup> Doxorubicin merupakan salah satu agen kemoterapi yang cukup efektif untuk berbagai tumor solid dan keganasan hematologi, seperti leukimia, limfoma, kanker payudara, kanker paru, multiple myeloma dan sarkoma. Namun, efektifitas doxorubicin dibatasi oleh kardiotoxik bergantung dosis kumulatif, yang dapat menyebabkan gagal jantung.<sup>25</sup> Sekitar 10% pasien yang menerima kemoterapi doxorubicin akan berisiko mengalami komplikasi jantung.<sup>26</sup>

Aktivitas antikanker doxorubicin melalui interkalasi dengan DNA dan menghambat topoisomerase II (TOP2) sel kanker, kemudian memicu terjadinya kematian sel.<sup>27</sup> Induksi kerusakan sel jantung oleh doxorubicin melalui mekanisme yang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Zhao dan Zhang pada tahun 2017 melaporkan mekanisme kardiotoxik doxorubicin melalui induksi death receptors (TNFR1, Fas, DR4 and DR5) dalam kardiomyosit. Induksi tersebut menyebabkan terjadinya apoptosis spontan, kemudian menurunkan detak jantung kardiomyosit. Zhao dan Zhang menggunakan sel iPS-CMs, derivat kardiomyosit sebagai model seluler untuk mempelajari kardiotoxik suatu senyawa. Sitotoksitas doxorubicin pada sel iPS-CMs mulai terlihat pada konsentrasi 500 nM, dengan nilai IC<sub>50</sub> 3500 nM pada

perlakuan 48 jam. Pengurangan dosis dengan tetap mempertahankan efektivitas doxorubicin menjadi salah satu cara untuk menurunkan efek kardiotosik. Hasil penelitian ini menunjukkan ko-administrasi GM 40 µg/mL dapat meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin 3 nM hingga 51%. Perlakuan tunggal doxorubicin membutuhkan konsentrasi 6 nM untuk menghasilkan efek sitotoksik 50% (IC<sub>50</sub>). Dalam penelitian ini tidak dilakukan efek sitotoksitas pada sel kardiomiosit, sehingga persentase pengurangan efek kardiotosik belum bisa ditetapkan dengan jelas. Namun demikian, berdasarkan hasil penelitian ini, GM cukup potensial dikembangkan menjadi agen kemopreventif untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensi dosis kemoterapi doxorubicin. Dukungan data ilmiah GM, terutama aktivitas dan kandungan kimianya belum tersedia hingga saat ini. Penelusuran kandungan metabolit sekunder hingga isolasi senyawa aktif penting dilakukan untuk melengkapi data fitokimia GM. Selain itu, perlu dilakukan penelitian aktivitas GM pada jenis sel kanker yang lain, serta potensi GM dalam menghambat karsinogenesis terutama tahap metastasis.

## KESIMPULAN

Kombinasi GM dengan doxorubicin menghasilkan efek sitotoksik sinergis. Sinergisme kombinasi dicapai melalui penghambatan siklus sel di fase G<sub>2</sub>/M dan peningkatan induksi apoptosis.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penelusuran senyawa aktif terutama terkait dengan efek sitototoksik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pimpinan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional yang telah memberikan ijin dan fasilitas sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Youlden DR, Cramb SM, Yip CH, Baade PD. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med*. Juni 2014;11(2):101–15.
2. Kementerian Kesehatan. Laporan Tim Riset Penyakit Tidak Menular: Tumor Payudara dan Lesi Prakanker Serviks. Badan Litbang Kesehatan, Jakarta: 2016.
3. Greenwald P. Science, medicine, and the future: Cancer chemoprevention. *BMJ*. 23 2002;324(7339):714–8.
4. Vejpongsa P, Yeh ETH. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(9):938–45.
5. Tsao AS, Kim ES, Hong WK. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin*. 2004;54(3):150–80.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
7. Naithani R, Huma LC, Moriarty RM, McCormick DL, Mehta RG. Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials. *Curr Med Chem*. 2008;15(11):1044–71.
8. Smith G. Guide to Succulents of Southern Africa. Penguin Random House South Africa; 2011.p344.
9. Van Jaarsveld E. Indigenous House Plants. *Veld & Flora*. 1999;34–6.
10. Haryanti S dan Widiyastuti Y. Aktivitas Sitotoksik pada Sel MCF-7 dari Tumbuhan Indonesia untuk Pengobatan Tradisional Kanker Payudara. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*;2017;27(4):247-254.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16 Desember 1983;65(1–2):55–63.
12. Abcam. Cell cycle analysis with flow cytometry & propidium iodide [Internet]. Abcam, USA; 2012 [dikutip 16 Oktober 2018]. Tersedia pada: <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining>
13. Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*. 1 Juni 1996;24(2):131–9.
14. Patrick Reynolds C, Maurer BJ. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Chemosensitivity Vol 1 Vitro Assays*. 2005;173–183.
15. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, dkk. Cell Viability Assays. Dalam: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, dkk., editor. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013 [dikutip 23 Februari 2018].



- Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
16. Jiang L, Tixeira R, Caruso S, Atkin-Smith GK, Baxter AA, Paone S, dkk. Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nat Protoc.* 2016;11(4):655–63.
  17. Nambiar KS, Hegde V. Apoptosis detection modalities: A brief review. *Int Dent Med J Adv Res.* 2016;2(1):1–5.
  18. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods.* 2015;423:99–103.
  19. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016(11):953–7.
  20. Fogarty CE, Bergmann A. Killers creating new life: caspases drive apoptosis-induced proliferation in tissue repair and disease. *Cell Death Differ.* 2017;24(8):1390–400.
  21. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):1–14.
  22. Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new?. *Future Oncol.* 2014;10(7):1215–37.
  23. Carrassa L. Cell cycle, checkpoints and cancer. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2014;18(1):67–75.
  24. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440–6.
  25. Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev.* 2011;7(4):214–20.
  26. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(6):1213–25.
  27. De Angelis A, Urbanek K, Cappetta D, Piegari E, Ciuffreda LP, Rivellino A, dkk. Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio-Oncol.* 2016;2:2.
  28. Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep.* 2017;7:44735.